利用CRISPR/Cas9技术构建AEG-1基因敲除U251细胞系并探讨其转移行为的特点*

盛玉瑞[2]，李斌[2]，王斌[1, 2]，左娣[1]，马琳[1]，任晓璠[1] ，郭乐[2, 3]**，刘昆梅[1]**

（1 宁夏医科大学宁夏颅脑疾病重点实验室 银川 750004 2 宁夏医科大学临床医学院 银川 750004 3 宁夏临床微生物重点实验室 宁夏医科大学总医院 银川 750003）

摘要：星形胶质细胞上调基因-1（astrocyte elevated gene-1，AEG-1）在多种肿瘤中过表达，参与肿瘤的形成、转移等过程。本实验利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 AEG-1 基因并研究其在胶质瘤细胞转移过程中的作用。首先设计构建 sgRNA/Cas9 二合一表达载体并转染到人胶质瘤 U251 细胞中，通过 TA 克隆测序鉴定 sgRNA 的活性；然后筛选建立稳定的AEG-1敲除U251细胞系，并利用Western blot实验检测AEG-1的敲除效率；最后利用 Transwell 小室、划痕实验评价 AEG-1 敲除后对肿瘤细胞迁移能力的影响。结果显示，成功构建靶向敲除 AEG-1 基因的 sgRNA/Cas9 二合一表达载体，所构建的载体与实验设计相一致，通过 TA 克隆测序鉴定 sgRNA 有活性；成功建立稳定的 AEG-1 敲除 U251 细胞系，Western blot 实验结果表明敲除效率高达 98%；Transwell 小室实验、划痕实验结果表明 AEG-1 敲除 U251 细胞系的转移能力明显降低。

关键词：星形胶质细胞上调基因-1（AEG-1） CRISPR/Cas9 基因敲除 U251细胞

胶质瘤是起源于神经外胚层的颅内常见肿瘤，占颅内肿瘤的50%以上，具有高发病率、高复发率、高病死率和低治愈率的特点。目前胶质瘤的治疗手段主要包括手术，放疗，化疗，X刀及γ刀等，尚无有效的治愈方法。星形胶质细胞上调基因-1（Astrocyte elevated gene-1, AEG-1）是Su等2002年用改良的快速减数杂交（rapid subtraction hybridization，RaSH）法首次发现 1型人类免疫缺陷病毒(HIV - 1)感染后星形胶质细胞中表达增高的新基因，该区域是与人类脑胶质瘤发生高度相关的地带[1]。该基因表达产物是由582个氨基酸组成的单次跨膜蛋白质[2-3]，现已证实*AEG-1*是Ras/PI3K/Akt/c-Myc 信号转导通路的下游靶分子，可以通过调控

*国家自然科学基金项目（31660267），宁夏回族自治区 2016 年大学生创新项目（201610752012），教育部“春晖计划”合作科研项目（Z2016060），宁夏高等学校科学技术研究项目（NGY201591），宁夏回族自治区“十三五”重大科技项目（2016BZ07）

**通讯作者，刘昆梅：Email：lkm198507@126.com；郭乐：Email：guoletian1982@163.com

PI3K/Akt、NF-κB、W nt/β-catenin、MAPK 等多条信号途径参与正常细胞转化，肿瘤细胞增殖、侵袭、转移、血管生成等肿瘤发生发展的多个环节，并能介导肿瘤细胞自噬活性和化疗耐药。近几年的研究主要聚焦于AEG-1促进肿瘤的进展和转移，认为AEG-1调节肿瘤转移的关键是增加了肿瘤细胞的侵袭性和黏附性 [4]。多项研究表明，AEG-1在胶质瘤中过表达[5-6]，与胶质瘤的发生、发展密切相关，发挥了癌基因的作用，且其表达水平随胶质瘤恶性程度增加而升高[7]。虽然AEG-1促进胶质瘤生长、侵袭及转移的具体机制尚不清楚，但AEG-1仍可作为评估胶质瘤的重要指标以及胶质瘤基因治疗的有效靶点 。

CRISPR/Cas9 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)是近年来发现的一种新型的基因组定点编辑技术。CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）系统是细菌对噬菌体的长期抗争过程中进化产生的一种获得性免疫防御系统，普遍存在于细菌与古生菌中，CRISPR系统由重复序列 (CRISPR array)和重复序列上游的Cas蛋白家族操纵子构成。外来序列经识别并插入到重复序列之间作为间隔序列(protospacers)，这样CRISPR系统就具有了识别外侵DNA的能力。经过人为改造后，可在真核细胞中实现高度灵活且特异的基因组编辑。CRISPR 系统主要依赖crRNA(CRISPR RNA) 和 tracr RNA(Trans-activating chimeric RNA) 结合并导向Cas (CRISPR-associated system)蛋白来对外源DNA进行序列特异性降解[8]。目前已经发现了3种类型的CRISPR/Cas系统：Ⅰ型、Ⅱ型和III型。其中Ⅱ型系统组分较为简单，主要依赖的是 Cas9核心蛋白，在RNA的介导下，Cas9 蛋白能够识别靶序列进行切割造成DNA的双链断裂(Double-strand breaks，DSB)。在此基础上，人们可以对基因组的特定位点进行基因打靶、基因定点插入、基因修复等各种遗传操作。这种新的基因组定点编辑技术比类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription

activator-like effector nuclease， TALEN)和锌指核酸酶 (Zinc-finger nuclease，ZFN)技术设计更加简单、更容易操作，势必会有更广泛的应用[9]。

本实验设计了靶向AEG-1基因特异性的sgRNA序列，并根据其序列合成了相应的正义链和反义链寡核苷酸。Addgene公司所提供的CRISPR/Cas9质粒pX459是一种二合一的质粒，在U6启动下，含有供sgRNA转录的结构(sgRNA scaffold)，其中含有两个串联的BbsI酶切位点，在其下游有CAG(CMV early enhancer/chicken β actin promoter)启动子指导的Cas9基因以及与转录有关的一些其他元件，如转录增强子和穿核序列。将两条寡核苷酸退火后插入到pX459质粒的BbsI酶切位点，从而构建AEG-1特异性的CRISPR/Cas9基因编辑载体，利用该载体含有嘌呤霉素抗性的特点，构建了稳定的AEG-1基因敲除的胶质瘤U251细胞系。利用该细胞系探讨AEG-1在肿瘤转移行为中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0购自Addgene公司（提供质粒的非盈利性组织，如图1(a) ）。用于AEG-1基因敲除的sgRNA序列为我们自己设计，与其相对应的寡核苷酸由金唯智生物科技有限公司合成。U251(人神经胶质瘤细胞系)细胞为本实验室保存。培养基为DMEM培养基（含10% 胎牛血清）。DNA提取试剂盒购自Omega公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化技术有限公司。用于检测sgRNA活性的引物由金唯智生物科技有限公司合成。

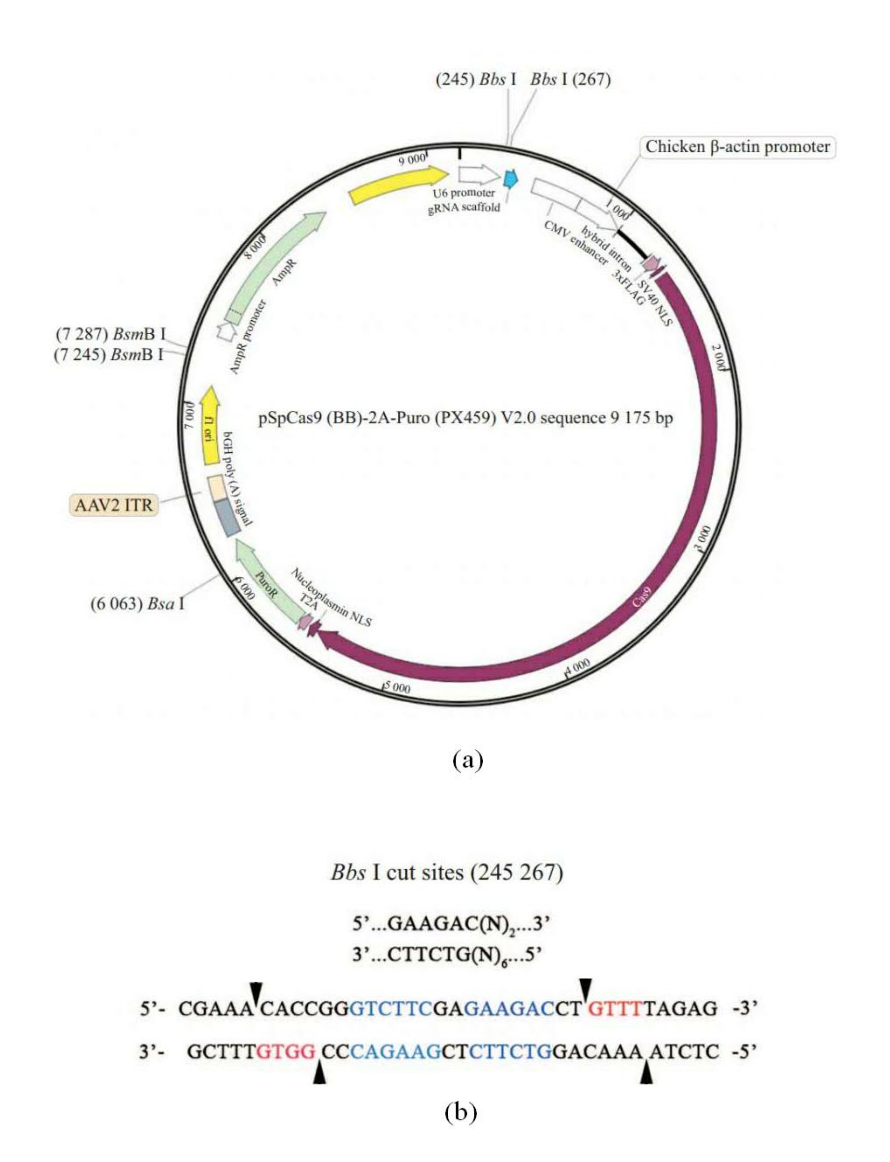


图 1　pX459 质粒图及 Bbs I 酶切位点

Fig.1　Schematic of p X459 plasmid and Bbs I endonuclease site

(a) schematic of pX459 plasmid, sgRNA scaffold is located under U6 promoter and contains 2 BbsI endonuclease sites

(b) BbsI endonuclease site, which can recognize GAAGAC sequence and cut from the 2nd base after that sequence and the 6th base from the complimentary strand to form the specific cohesive terminus.

1.2 AEG-1 sgRNA序列设计及合成对应的Oligo

人的AEG-1基因有6个转录本(ENST00000336273.7)， 12个外显子， 位于八号染色体上(97，644，179-97，728，770)。选择第2、3、4个外显子为对象进行靶点筛选。经过网站(http://crispr.mit.edu/)分析得出具体sgRNA得分后，在三个外显子中

各选一个得分较高的序列作为备选序列，分别是AEG-1-sgRNA-1、AEG-1-sgRNA-2、AEG-1-sgRNA-3。根据pX459被BbsI酶切后所得的黏性末端特点（图1b），在设计的sgRNA两端分别在5′端前加上CACCG，反向链3′端加C，同时，5′端加前AAAC，和pX459酶切后的黏性末端相吻合，共设计6段Oligo序列，见表1。

表1 AEG-1 sgRNA核酸片段

Table 1 AEG-1 sgRNA Oligo

名称 Name	序列 Sequence
AEG-1-sgRNA-1	5'-CACCGACTTCAACAGTCCGCCCATT-3' 3'-CTGAAGTTGTCAGGCGGGTAACAAA-5'
AEG-1- sgRNA-2	5'-CACCGCAAAACAGTTCACGCCATGA-3' 3'-CGTTTTGTCAAGTGCGGTACTCAAA-5'
AEG-1- sgRNA-3	5'- CACCGACAGCAGCGTAAACGTGATA-3' 3'- CTGTCGTCGCATTTGCATATCAAA-5'

1.3 pX459-AEG-1 质粒构建

1.3.1 pX459质粒酶切

用限制性核酸内切酶BbsI将pX459质粒酶切，之后进行琼脂糖凝胶电泳进行酶切鉴定，回收酶切后线性化的质粒。回收的pX459再次进行琼脂糖凝胶电泳鉴定是否回收成功。将酶切回收产物-20℃保存供后续连接用。

1.3.2 AEG-1 sgRNA Oligo退火形成双链DNA

将合成的sgRNA Oligo稀释成浓度为10μmol/L的溶液，取20μL的正反链sgRNA Oligo溶液，加退火缓冲液20 μL，并加双蒸水使其终体积为200 μL。混匀后，置入水浴中煮沸5 min。然后，使其自然降低到室温，形成双链DNA，用于之后的连接实验。

1.3.3 pX459-AEG-1载体克隆和鉴定

将1μL酶切回收的线性化的pX459载体和5μL退火后的双链DNA，加1μL T4连接酶和相应buffer在16 °C条件下连接过夜。第2天，将连接物转化到DH5α感受态细胞中，然后进行涂板，37 °C孵箱培养过夜。次日挑取单克隆菌，加入到具有氨苄抗性的LB培养基中培养，37 °C恒温箱振荡培养12 h后提取质粒。纯化的质粒分别用EcoRI和BbsI酶切鉴定，以确定供体DNA的插入，并同时进行DNA序列分析，以确定插入序列的正确。

1.3.4 pX459-AEG-1载体sgRNA活性鉴定

将克隆的质粒pX459-AEG-1-1、pX459-AEG-1-2和pX459-AEG-1-3转染到U251细胞中，48h后提取基因组DNA。设计sgRNA对应切除基因片段上下游引物(表2)，进行PCR扩增。短链PCR产物纯化后将其克隆在TA克隆载体PMD-19之中，进行蓝白斑筛选实验，选取阳性克隆，提取质粒，进行序列分析，以检测sgRNA基因敲除效率。

表2 用于TA克隆的短链PCR引物

Table 2 PCR primers for short-chain PCR and used for TA cloning analysis

名称 Name	序列 Sequence	PCR产物大小 The size of PCR product
Short-chain primer of AEG-1-1	5'-TCCTGCGTATAAATCTTTG-3' 3'-TTTACCACCCATCCACTA-5'	324
Short-chain primer of AEG-1-1	5'-TAAAGCAGTGCAAAACAG -3' 3'-TTCCAGGAGACAAAGACA-5'	325
Short-chain primer of AEG-1-1	5'-GGTGCTGACTGATTCTGG -3' 3'-CTGCTGGTATTCGGTAAA-5'	293

1.4 AEG-1敲除细胞系的构建

1.4.1 将有活性的pX459-AEG-1质粒转染到U251细胞中

将U251细胞接种于6孔板中，每孔8×10^5个细胞。次日待细胞长至90%融合时进行转染，无需更换培养基，用Lipofectamine 3000进行转染，转染过程严格按照说明书进行。转染后2-4d后根据细胞状况更换培养基。第5d在培养基中添加嘌呤霉素，使其终浓度为3μg/mL。在该浓度嘌呤霉素作用下，未转的入质粒的细胞将会被杀死，进行为期7d的细胞筛选。前期嘌呤霉素的浓度梯度实验已证明，在5~7d时，未成功转染细胞能被全部杀死。成活的细胞已成功转入pX459-AEG-1质粒。

1.4.2 单克隆AEG-1敲除细胞系的构建

将每孔细胞消化下来，进行无限稀释，接种在96孔板中，挑选每孔只有一个单细胞的进行培养，培养基中嘌呤霉素的浓度可下调至1μg/mL。等细胞长成单克隆细胞团，将其消化下来转入48孔板进行扩大培养，直到最终转入培养瓶中细胞能够稳定生长。

1.5 Western blot实验检测AEG-1的蛋白表达水平

从U251细胞和各AEG-1敲除细胞系中提取总蛋白，加入裂解液裂解，每5min震荡1次，5次后以15000 r/min离心15 min，收集上清。测定蛋白浓度后(保证相关系数在0.99以上为准)将蛋白按比例与蛋白Loading buffer和水混匀后置于100°C金属浴5min变性，然后进行Western blot，每孔上样50μg总蛋白，再进行聚丙酰胺凝胶电泳。电泳结束后，转膜，用5%的脱脂奶粉液进行封闭， 一抗4°C结合过夜，荧光二抗常温孵育2 h后，在Odyssey CLX扫描仪上进行扫描。然后用Image J软件进行数据化处理，数值结果用GraphPad prism软件进行统计学分析。

1.6 Transwell小室实验和细胞划痕实验检测细胞系的转移能力

1.6.1 Transwell小室实验

用已预冷的不含血清的DMEM培养基来稀释matrigel基质胶（培养基：matrigel=5:1），快速充分混匀后，立即加入上室各100μL，37 °C干燥2h。将各组细胞制成细胞悬液，计数，每孔加入100μL细胞悬液，每孔1×10^5个细胞。下腔加入500μL含10%FBS的培养液，放入37°C5%CO_2培养箱中培养24小时。后移出小室，用结晶紫染色30min。PBS洗5遍后，在显微镜下观察和照相。

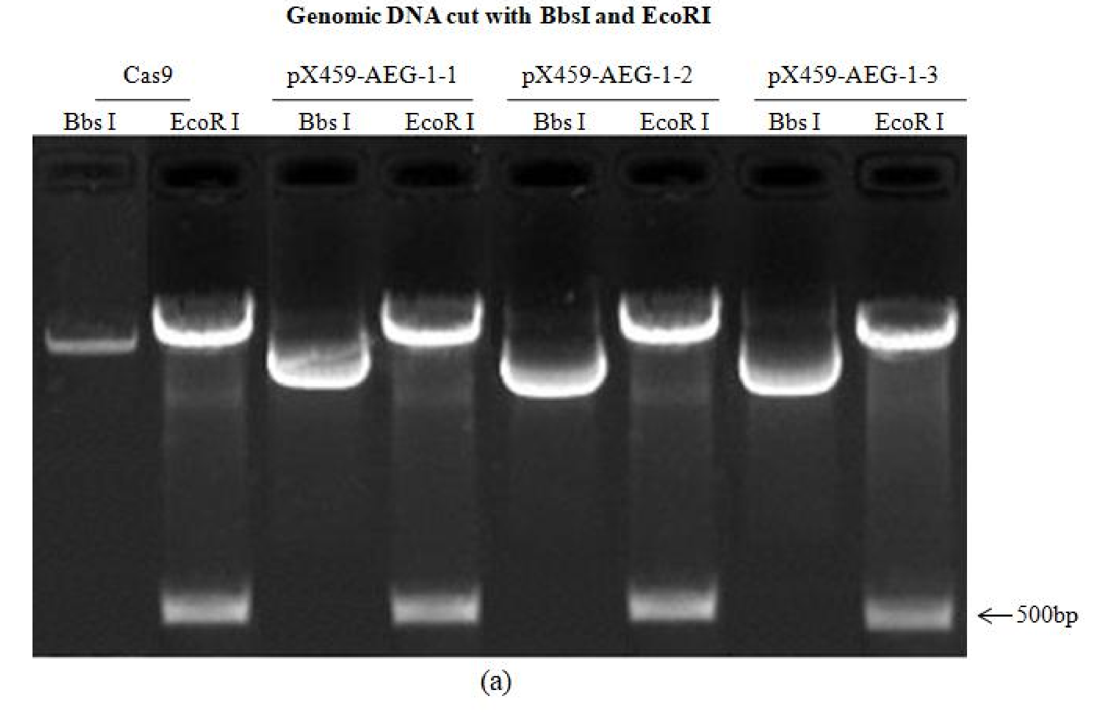
1.6.2 细胞划痕实验

取生长状态良好的培养细胞，用PBS液洗3次，胰酶消化，细胞悬液反复吹打，使细胞充分分散。用marker笔在6孔板背后，用六孔板盖比着均匀得划出横线，大约平均每隔1cm道，每个孔至少划5条线。然后，接种细胞到孔培养板中，每种细胞接种3孔，待细胞长满后，用枪头比着六孔板盖，垂直于背后横线来划痕，用PBS洗细胞3次，去除漂浮的细胞，然后加入1%血清的培养基，放入37 °C5%CO_2培养箱中培养，0H， 48H拍照取样。划痕相对迁移距离= 0H划痕宽度- 48H划痕宽度

2 结果与分析

2.1 pX459-AEG-1质粒鉴定

pX459质粒和三段oligo连接提取质粒之后，用EcoRI和BbsI酶切鉴定，结果见图2 (a)，然后将质粒交由金唯智生物科技有限公司进行DNA测序，结果见图2 (b)，两种结果证实，所克隆的pX459-AEG-1克隆有供体DNA的插入，其序列与实验前的设计一致。



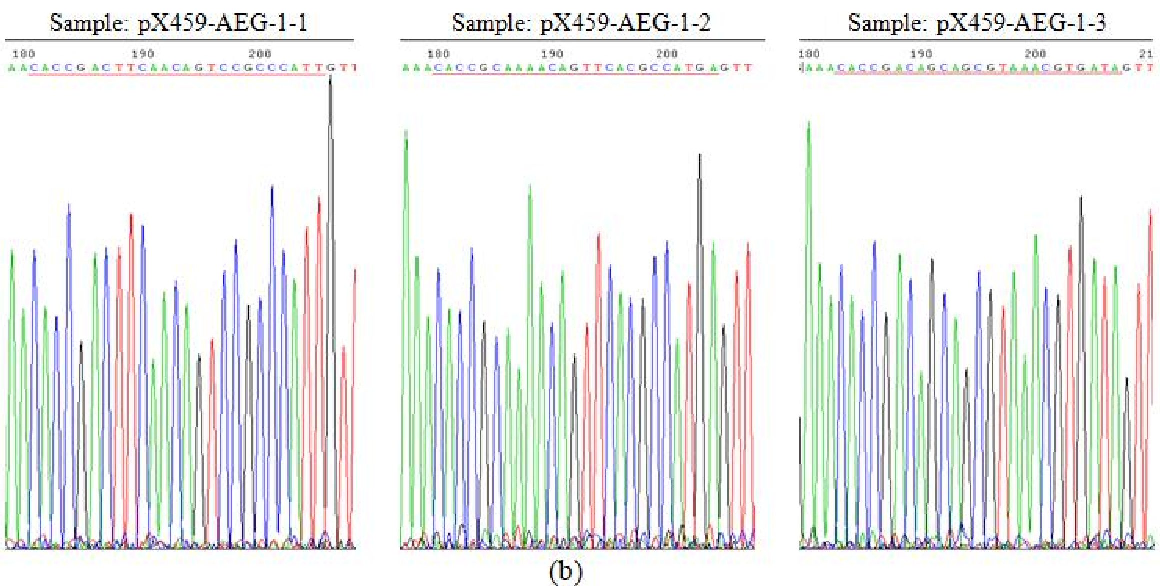


图 2　pX459-AEG-1 鉴定结果
Fig.2　Identification of pX459-AEG-1

(a) Enzyme digestion results illustrated that all the plasmids had donor DNA insert
(b) DNA sequencing of pX459-AEG-1, the results demonstrated that all the plasmids had donor DNA insert with correct ORF

2.2　sgRNA活性鉴定短链PCR产物TA克隆分析

将短链PCR克隆到PMD-19克隆载体中，然后选取阳性克隆进行序列分析，以检查Indel(插入或缺失)突变。结果发现，在PCR产物中，pX459-AEG-1-1未检测到突变，pX459-AEG-1-2 (图3 a)和pX459-AEG-1-3 (图3b)存在多种形式的突变。

Identities 325/326(99%) Gaps 1/326(0%)

```
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCA-TGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAG
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCATTGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAG
```

Identities 325/327(99%) Gaps 2/327(0%)

```
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCA--TGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGA
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCATTTGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGA
```

Identities 324/325(99%) Gaps 1/325(0%)

```
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCATGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAGC
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCC-TGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAGC
```

Identities 325/327(99%) Gaps 2/327(0%)

```
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCATGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAGC
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCA--ATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAGC
```

Identities 319/325(98%) Gaps 6/325(1%)

```
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTCACGCCATGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAGC
TAAAGCAGTGCAAAACAGTTC------TGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTACTTGAGC
```

(a)

Identities 291/293(99%) Gaps 0/293(0%)

```
GGTGCTGACTGATTCTGGTTCATTGGATTCAACTATCCCTGGGATAGAAAATACCATCAC
GGGGCTGACTGATTCTGGTTCATTGGATTCAACTATCCCTGGGATAGAAAATACCATCAC

TATATTAGTGGAACATAAGACAGTGGTACATCAAATCAAACTCCTTTTATTCGGATGTAC
TATATTAGTGGAACATAAGACAGTGGTACATCGAATCAAACTCCTTTTATTCGGATGTAC
```

Identities 277/293(95%) Gaps 1/293(0%)

```
GGTGCTGACTGATTCTGGTTCATTGGATTCAACTATCCCTGGGATAGAAAATACCATCAC
GGTGCTGGTAGATTGTGGTTCAATGCATTCAACTCTCCCTGGGATAGAAAATGCCATCAC

AGTTACCACCGAGCAACTTACAACCGCATCATTTCCTGTTGGTTCCAAGAAGAATAAAGG
AGTTACCACCGAGCAACTTACAACCGCATCATTTCCTGTTGGTTCCAAGAAGAATACAGG

TATATTAGTGGAACATAAGACAGTGGTACATCAAATCAAACTCCTTTTATTCGGATGTAC
TATATTAGTGGAACATAAGACAGTGGTACATCAAATCAAACTCCTTTTATTCGGATGTAC

AAAATATCATTATGTCAAAATCTGACTATTTTGAATGCTAACATCATTGTGCTGATATAC
AAAATATCATTATGTCAAAATATGACTATTTTGAATGCTAACATCATTGTGCTGATATAC

CCTTCTTCATGAGAGTATTGTGAACCATGTATCGGTTTACCGAATACCAGCAG
CCTTCTTCATGAGAGTATTGTGAACCATGTATCGCCTG-CCGCATTCCAGCAG
```

Identities 263/292(90%) Gaps 0/292(0%)

```
GGTGCTGACTGATTCTGGTTCATTGGATTCAACTATCCCTGGGATAGAAAATACCATCAC
GGGGCGGACTGATTCTGGTTCATTGGATTCTACTATCCCTGGGATAGAAAATGCCATCAC

AGTTACCACCGAGCAACTTACAACCGCATCATTTCCTGTTGGTTCCAAGAAGAATAAAGG
AGTTACCACCGAGCAACTTACAACCGCATCATTTCCTGTTGGTTGATATAAGAGTACAGG

TATATTAGTGGAACATAAGACAGTGGTACATCAAATCAAACTCCTTTTATTCGGATGTAC
TAAATTAATGGAACATGATACGGTGGTACATCGTATCATGCTCCTTTTATTCAGATGTAC

AAAATATCATTATGTCAAAATCTGACTATTTTGAATGCTAACATCATTGTGCTGATATAC
TCTATATCATTATGTCAAAATCTGACTATTTTGAATGCTAACATCATTGTGCTGATATAG

CCTTCTTCATGAGAGTATTGTGAACCATGTATCGGTTTACCGAATACCAGCA
CCTTCTTCATGACAGTATAGAGAACCATGTATCGATTTACAGAATACCAGCA
```

(b)

图 3 TA 克隆分析检测 Indel 突变

Fig.3 TA cloning analysis to identify Indel mutations

(a) The mutations of pX459-AEG-1-2 **(b)** The mutations of pX459-AEG-1-3

2.4 Western blot分析AEG-1表达水平并检验敲除效率

从所建立的稳定的AEG-1基因敲除细胞中提取蛋白。同时，提取转染了pX459空载质粒的U251细胞和正常的U251细胞的蛋白作为对照，进行Western blot(图4 a)，然后用Image J软件进行数据化处理，数值结果用GraphPad prism软件进行统计学分析(图4 b)。结果发现，转染了pX459空载质粒的U251细胞的AEG-1蛋白表达水平有所降低。在建立AEG-1基因敲除的稳定细胞系中，pX459-AEG-1-3的效率最好，敲除效率达到了98%。

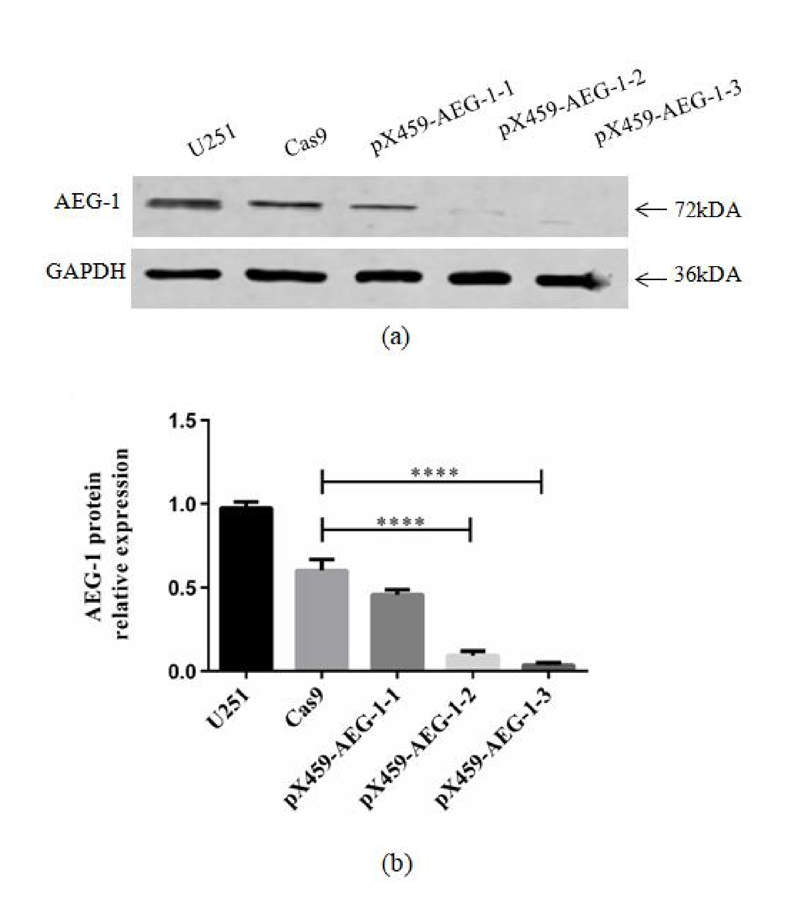


图 4 AEG-1 基因在 AEG-1 基因敲除细胞系中的表达水平

Fig.4 Evaluation of AEG-1 gene expression in stable AEG-1 gene knock out cell lines

(a) Western blot verified the protein expression level of AEG-1

(b) GraphPad prism software analyzed the results of Western blot.The efficiency of pX459-AEG-1-3 was the best. The knockout efficiency reached 98% , **** P<0.001 vs control (Cas9) group

2.5 Transwell小室实验检测AEG-1基因敲除细胞系的侵袭能力

Transwell小室放入培养箱中培养24小时后，移出小室，用结晶紫染色30min。PBS洗5遍后，在显微镜下观察和照相。在显微镜下观察和拍照Transwell小室结果如图6，Cas9对照组细胞的转移能力稍弱于正常U251细胞组，但明显强于AEG-1基因敲除的三组细胞系。

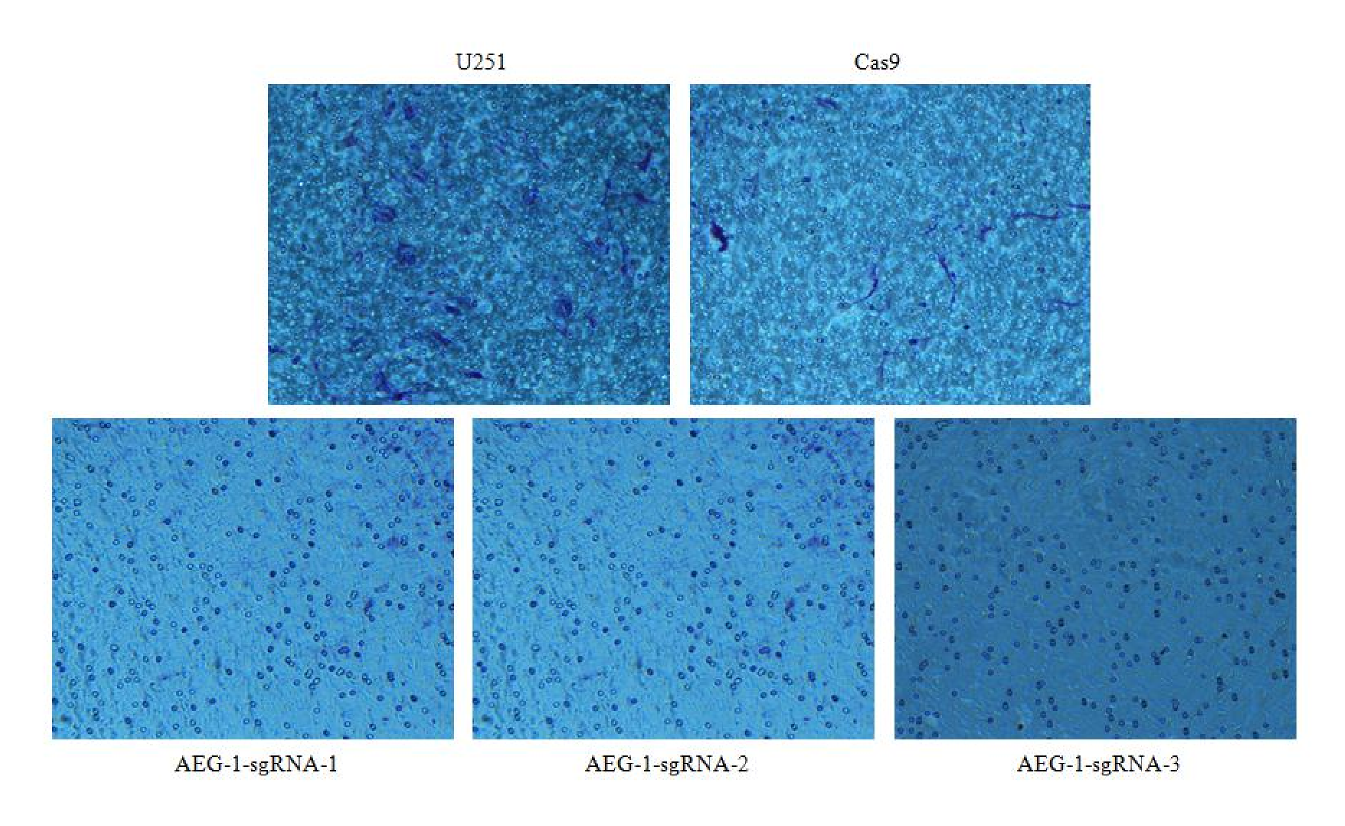


图5 Transwell小室实验检测AEG-1基因敲除细胞系的侵袭能力
Fig.5 Transwell chamber experiments test the invasive ability of the AEG-1 knockout cell lines

2.6 划痕实验检测AEG-1基因敲除细胞系的迁移能力

做好划痕后，在0H，48H拍照取样，间隔时间将六孔板放入培养箱中培养。将0H，48H结果对比作图（图6a）, 各组划痕相对迁移距离均与正常组作比值，数值结果用GraphPad prism软件进行统计学分析(图6b)

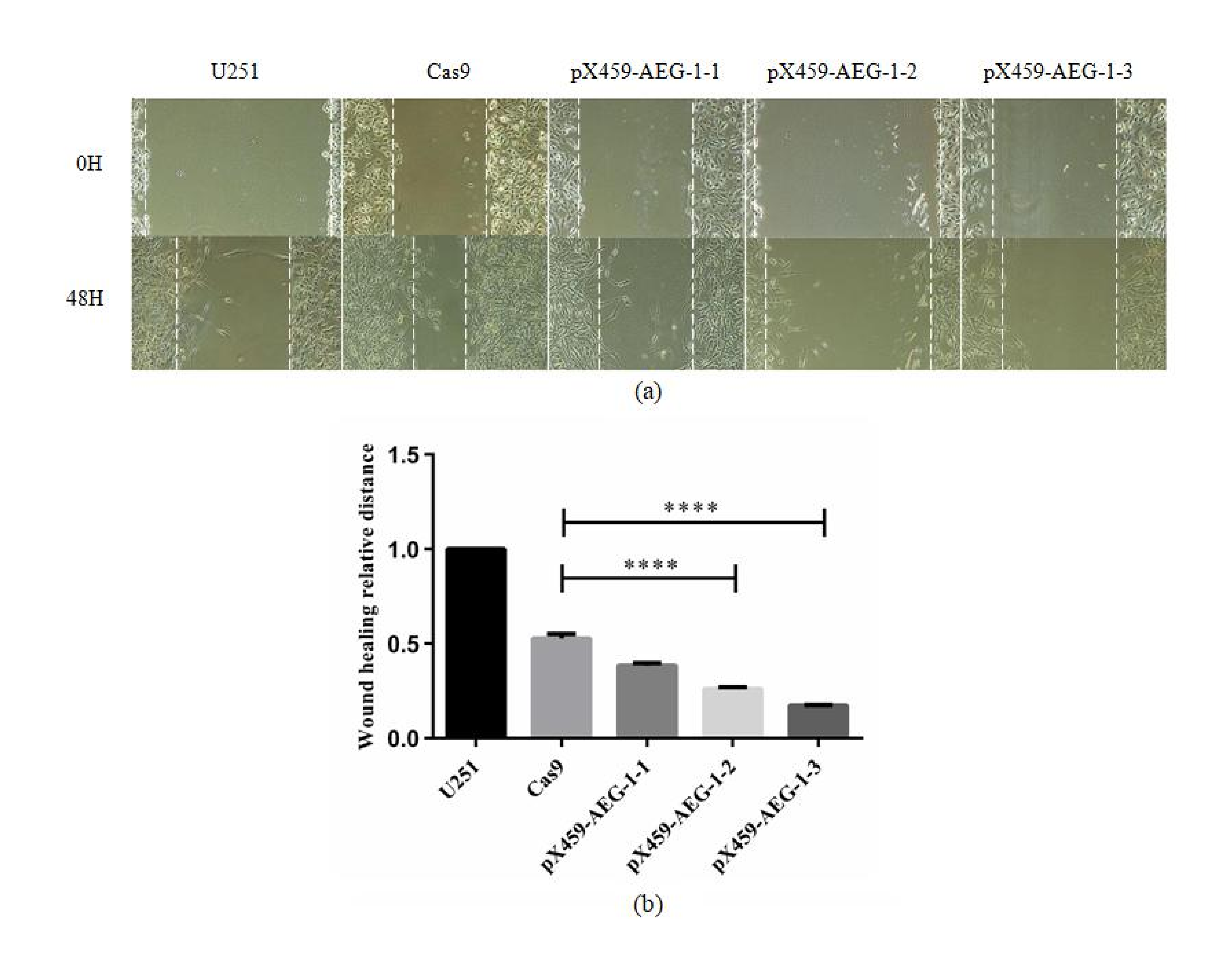


图6 划痕实验检测AEG-1基因敲除细胞系的迁移能力

Fig.6 Scratch experiments test the migration ability of the AEG-1 knockout cell lines

(a) Scratch experiments verified the wound healing distance of AEG-1

(b) GraphPad prism software analyzed the results of scratch experiments, **** P<0.001 vs control (Cas9) group

3. 讨论

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤，其发生发展是许多相关基因共同参与、相互作用的结果。多项研究表明， AEG-1 为胶质瘤发生发展过程中的关键癌基因[10]。胶质瘤的侵袭性生长包括细胞黏附、运动及细胞外基质（extracellular matrix， ECM)降解等诸多过程，所涉及的分子机制十分复杂。而 AEG-1 可以增加胶质瘤细胞的黏附性和侵袭性，其信号转导通路为 AEG-1 作为 Ha -ras 下游的靶基

因通过激活 NF -κB 发挥作用。有实验证明，小 RNA 干扰（RNAi）沉默 AEG-1 基因后能够降低脑胶质瘤细胞的侵袭和转移能力[7]。小 RNA 干扰技术虽有较高的特异性，但制作成本高、定制周期长、需要同时设计多对 siRNAs，且满足不了一些有特殊需求的基因编辑的条件。制备 siRNAs 比较常见的做法是用其他方法筛选出最有效的序列再进行化学合成，方法繁琐复杂，限制了该技术的推广。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术作为新兴的基因编辑技术近几年获得广泛的关注。这一高效而简单的基因编辑技术，为更多的实验平台提供了有力的研究基因功能的武器。尤其在发现 CRISPR/Cas9 技术可以编辑哺乳动物基因组之后，该技术迅速得到推广应用，包括二十世纪初的动物模型构建、基因功能研究、肿瘤基因敲除[11-12]，以及最近在肿瘤免疫治疗中的应用（免疫检查点阻断疗法、过继性细胞治疗、抗体靶向疗法等）[13-20]。肿瘤靶向治疗作为多年来生物学的研究热点，同样受益于 CRISPR/Cas9 技术发展迅猛。从单一肿瘤相关基因功能的研究到小鼠肿瘤模型的构建，再到 Cas9 衍生技术用于肿瘤相关表型基因的筛选以及在肿瘤基因治疗中的探索[21]。在未来医疗领域，CRISPR/Cas9 技术的发展势必颠覆传统肿瘤的治疗手段[22]。

本实验利用 CRISPR/Cas9 技术敲除人胶质瘤 U251 细胞系 AEG-1 基因，确证 AEG-1 对胶质瘤转移能力的影响。实验结果显示 CRISPR/Cas9 技术可以有效、快速地敲除人胶质瘤细胞系 AEG-1 基因，并且敲除 AEG-1 基因的人胶质瘤细胞系转移能力明显下降。该实验确证 AEG-1 能有效促进胶质瘤的转移行为，同时验证了 CRISPR/Cas9 是高效、简便的基因编辑技术。虽然 AEG-1 作用于胶质瘤转移行为的信号通路的尚未得到充分理解,仍需要更多的模型系统来被证实，CRISPR/Cas9 作为新的基因编辑技术仍然存在一些技术缺点，比如脱靶现象的出现、无法确保细胞靶向性等等[23],但是利用 CRISPR/Cas9 技术抑制胶质瘤 AEG-1 表达很可能被应用于新的胶质瘤治疗策略。该治疗策略操作简单，会有效、迅速抑制胶质瘤的增殖,降低胶质瘤全身扩散转移的几率，甚至可以完全治愈以及预防胶质瘤的发生。相信

在不远的将来，CRISPR/Cas9 技术基因编辑 AEG-1 治疗胶质瘤的治疗手段得以实现，为广大胶质瘤患者带来福音。

参考文献

[1] Yoo BK, Emdad L, Lee SG, et al. Astrocyte elevated gene-1(AEG-1):A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. Pharmacology & Therapeutics, 2011, 130 (1) : 1-8.
[2]Lee SG, Kang DC, DeSalle R, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC, the beginning: initial cloning, structure, expression profile, and regulation of expression. Adv Cancer Res, 2013, 120: 1-38.
[3]Ash SC, Yang DQ, Britt DE. LYRIC/AEG-1 overexpression modulates BCCIPalpha protein levels in prostate tumor cells. Biochem Biophys Res Commun JT-Biochemical and biophysical research communications,2008,371(2):333-338.
[4] Emdad L, Lee SG, Su ZZ, et al.Astrocyte elevated gene-1(AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA JT-Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2009,106(50):21300-21305.
[5]Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, et al. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1,AEG-1.Gene JT-Gene,2005,353(1):8-15.
[6]Yoo BK, Chen D,Su ZZ,et al.Molecular Mechanism of Chemoresistance by Astrocyte Elevated Gene-1 Cancer Res JT-Cancer research,2010,70(8):3249-58.
[7]Emdad L,Sarkar D,Lee SG,et al.Astrocyte elevated gene-1:a novel target for human glioma.Mol Cancer Ther JT-Molecular cancer therapeutics,2010,9(1):79-88.
[8]Sander JD,Joung JK.CRISPR-Cas systems for editing,regulating and targeting genomes.Nat Biotechnol,2014,32(4): 347-355.
[9] Pelletier S, Gingras S, Green DR.Mouse genome engineering via CRISPR-Cas9 for study of immune function.Immunity,2015,42(1):18-27.
[10]Liu L,Wu J,Ying Z,et al.Astrocyte Elevated Gene-1 Upregulates Matrix Metalloproteinase-9 and Induces Human Glioma Invasion.Cancer Res JT-Cancer research, 2010, 70(9):3750-3759.
[11]Ota S, Kawahara A,Zebrafish:a model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders.CongenitAnom,2014, 54(1):8–11.
[12]Xue W,Chen SD,Yin H,Tammela T,Papagiannakopoulos T,Joshi NS,Cai WX,Yang GL,Bronson R, Crowley DG,Zhang F,Anderson DG,Sharp PA,Jacks T.CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver.Nature,2014,514(7522):380–384.
[13]Su S,Hu B,Shao J,et al.CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients.Sci Rep,2016,6:20070.
[14]Ren J,Zhang X,Liu X,et al.A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation.Oncotarget,2017,8(10):17002-17011.
[15]Merhavi-Shoham E,Itzhaki O,Markel G,et al.Adoptive cell therapy for metastatic melanoma.Cancer J,2017,23(1):48-53.
[16]Shao H, Lin Y, Wang T, et al.Identification of peptide-specific TCR genes by in vitro peptide stimulation and CDR 3 length polymorphism analysis.Cancer Lett,2015,363(1):83-91.
[17]邵红伟,陈辉,彭鑫等.CRISPR-Cas9 系统定向编辑 TCR 基因的 sgRNA 筛选.集美大学学报(自然版) ,2015,20 (4):265-270.
Shao HW,Chen H,Peng X,et al.SgRNA screening of directed edited TCR gene in CRISPR-Cas9 system.Jimei University(Natural Edition),2015, (4):265-270.

[18]Ren J, Liu X, Fang C,et al.Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition.Clin Cancer Res,2016,23 (9):2255-2266.
[19]Steinhart Z,Pavlovic Z,Chandrashekhar M,et al.Genome-wide CRISPR screens reveal a Wnt-FZD5 signaling circuit as a druggable vulnerability of RNF43-mutant pancreatic tumors.Nat Med,2017,23 (1):60-68.
[20]Cheong TC,Compagno M,Chiarle R.Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR-Cas9 system.Nat Commun,2016,7:10934.
[21]Cong L,Ran FA,Cox D,et al.Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 2013, 339(6121): 819–823.
[22] Jinek M, Jiang F, Taylor DW, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science 2014; 343(6176): 1247997.
[23]Liu L, Fan XD. CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. Plant Mol Biol, 2014, 85(3): 209-218.

The Construction of AEG-1-Knockout U251 Cell Line by CRISPR/Cas9 Technology and Study of The Effect of AEG-1 on the Metastasis in U251 Cells

Sheng Yu-rui[2], Li Bin[2], Wang Bin[1,2],Zuo Di[1], Ma Lin[1], Ren Xiao-fan[1], Guo Le[2,3]**,Liu Kun-mei[1]**

（1 Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China　2 Ningxia Medical University Clinical Medical College , Yinchuan 750004, China 3 Ningxia Clinical Microbiology Key Laboratory, Yinchuan 750003, China）

Abstract: Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) was overexpressed in a diverse array of cancers and played an important role in the development and progression of cancer. The study aimed to construct the AEG-1-knockout U251 cell line by CRISPR/Cas9 technology and to explore the effect of AEG-1 on the metastasis in U251 Cells. Firstly, the designed sgRNA targeted to AEG-1 was synthesized, and was cloned into the pX459 plasmid to obtain the AEG-1-pX459 recombinant vector. The recombinant vector was transfected into human glioma U251 cells, and the activity of sgRNA was identified by TA cloning sequencing. Then, the U251 cells transferred with the recombinant vector were screened by puromycin to get the AEG-1-knockout cell line. The efficiency of gene knockout was detected by western blot assay. Finally, the migration ability of the AEG-1-knockout cell line was evaluated by the methods of transwell and Scratch experiment. The results showed that the AEG-1-pX459 recombinant vector was

successfully constructed, and the sgRNA activity was confirmed by TA cloning sequencing. The AEG-1-knockout U251 cell line was successfully established. Western blot assay analysis showed that the knockout efficiency high to 98%. The transwell and scratch experiment results illustrated that the migration ability of the AEG-1-knockout cell line reduced obviously.

Keywords: Astrocyte Elevated Gene-1(AEG-1) CRISPR/Cas9 gene knockout U251 cells